Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Serie Zoología 72(2): 285-289. 2001

Relación entre bacterias del género *Vibrio* y copépodos parásitos del mejillón *Mytilus galloprovincialis*

Smidu *et al.* (1971. *Canadian Journal of Microbiology 44*: 1047-1058); Kaneko & Colwell (1975. *Applied Microbiology 29*: 269-274); Sochard *et al.* (1979. *Applied Environmental Microbiology 37*: 750-759) registraron la presencia de varios géneros de bacterias heterotróficas en la superficie del exoesqueleto y en el tracto digestivo de algunas especies de copépodos marinos de vida libre. De estos géneros, *Vibrio* fue el más abundante. Además, Huq *et al.* (1983. *Applied Environmental Microbiology 45*: 275-283) reconocieron una asociación entre *V. cholerae* (serotipo O1) patogénica y copépodos de vida libre. La asociación de especies de *Vibrio* patogénicas y copépodos marinos de vida libre está relacionada con la presencia de quitina, substancia que conforma el exoesqueleto de los copépodos (Kaneko & Colwell 1975. *Applied Microbiology 29*: 269-274; Colwell *et al.* 1980. *Memoirs of the 15 U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program Joint Conference on Cholera*, pp. 44-56), el mecanismo de adhesión se realiza por medio de proteínas superficiales que permiten a las bacterias adherirse a la quitina en detritus y microcrustáceos (Tarsi & Pruzzo 1999. *Applied Environmental Microbiology 65*(3): 1348-1351). Colwell (1996. *Science* 274: 2025-2031) considera que el transporte de bacterias por el zooplancton es el mecanismo básico para la dispersión del cólera entre áreas afectadas por la enfermedad y otras áreas no directamente influenciadas. En el agua de zonas costeras, la observación de la sucesión y abundancia de copépodos y otros miembros del zooplancton con estructuras quitinosas puede alertar sobre la posibilidad de un brote de la enfermedad del cólera. El incremento en la abundancia de copépodos y otros organismos con exoesqueleto quitinoso, propicia, a su vez, un incremento en el sustrato para el desarrollo de bacterias quitinolíticas, entre ellas, algunas del género *Vibrio*. Por todo lo anterior, la asociación de bacterias del género *Vibrio*, y en particular de aquellas patogénicas para humanos, tales como *V. cholerae* (serotipo O1) con copépodos marinos tiene gran importancia tanto epidemiológica como ecológica.

Más de 200 especies de moluscos bivalvos, incluyendo al mejillón comestible, ostiones y almejas, se han registrado como hospederos de copépodos parásitos (Ho 1995, *Sixth International Workshop of the Tropical Marine Mollusk Program*. Annamalai University, Parangipettai, India, pp. 12-20, Abstract). Mycolidae es la familia mejor representada por su diversidad y abundancia, y por la gran cantidad de géneros y

especies que hay de estos copépodos, se conoce que están asociados con bivalvos. A pesar de la importancia de los moluscos bivalvos como fuente de alimento en todo el mundo y del conocimiento de la asociación entre bacterias del género *Vibrio*, y en particular de *V. cholerae* (serotipo O1) y copépodos marinos de vida libre, no existe ningún estudio sobre la asociación de especies del género *Vibrio* y copépodos parásitos de moluscos bivalvos comestibles. Cáceres-Martínez *et al*. (1996. *Journal of Shellfish Research 15*: 667-672) detectaron la presencia de copépodos parásitos *Pseudomyicola spinosus* (Rafaelle & Monticelli 1885) (Mycolidae) y *Modiolicola gracilis* (Wilson 1935) (Clausidiidae) en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, en Baja California, México. Dado que el exoesqueleto de los copépodos parásitos de este contiene quitina, es entonces probable el desarrollo de bacterias quitinolíticas sobre él. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar si los copépodos parásitos del mejillón *M. galloprovincialis* están asociados con especies del género *Vibrio*, particularmente con *Vibrio cholerae* (serotipo O1).

Durante mayo de 1996, sesenta ejemplares adultos de *M. galloprovincialis* con una talla promedio de 58.0 mm, desviación típica (DT) = 9.02, fueron recolectados de los pilotes del muelle de la bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, zona contaminada por aguas residuales domésticas y donde se ha reconocido la incidencia de *Pseudomyicola spinosus* y *Modiolicola gracilis* (Cáceres-Martínez *et al.* 1996, *op. cit.*). Después de remover la epifauna de las conchas de los mejillones, éstos se colocaron en cajas Petri y se abrieron. El líquido intervalvar fue recuperado en la caja Petri; enseguida, la carne del mejillón (manto y branquias) y el líquido intervalvar se revisaron bajo un microscopio estereoscópico para determinar la presencia de copépodos. Se encontraron las dos especies de copépodos parásitos antes mencionadas en los mejillones recolectados. Ambas especies de copépodos se transfirieron en condiciones de esterilidad al medio de agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa) para determinar la presencia de especies del género *Vibrio*. En las transferencias al medio de cultivo se consideraron las siguientes combinaciones: (CV) copépodos vivos, machos y hembras con sacos ovígeros; (THC) tejido homogeneizado de copépodos previo enjuague de los mismos en agua de mar esterilizada; (LI) líquido intervalvar del mejillón sin copépodos; (ACS) agua proveniente de un vaso de precipitado con agua de mar estéril en donde se colocaron copépodos y se sonicaron (50W/1.9L) y (D) detritos de la cavidad paleal. Cada cultivo se realizó por triplicado. Para la identificación de bacterias del género *Vibrio* y de *V. cholerae*, en particular, las colonias fueron aisladas después de 24 y 48 horas de incubación y sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas: agar triptona 1% y cloruro de sodio 1% (T_1N_1 a 37°C), desoxicolato de sodio, oxidasa, agar triptona 1% sin cloruro de sodio (T_1N_0 a 37°C), tinción de Gram, agar triptona 1% y cloruro de sodio 1% (T_1N_1 a 42°C), ornitina descarboxilasa, lisina descarboxilasa, arginina dehidrogenasa, agar triptona 1% y cloruro de sodio 6%, agar triptona 1% y cloruro de sodio 8%, agar triptona 1% y cloruro de sodio 10% (FDA 1992. *Bacteriological analytical manual*. AOAC International, pp. 111-140). Una línea patogénica de *V. cholerae* O1 (Perú C6707) fue utilizada como control.

Se registró el crecimiento de bacterias del género *Vibrio* en el medio TCBS para todas las combinaciones estudiadas. Los resultados revelan que las bacterias se pueden encontrar en cualquier parte de la cavidad paleal del mejillón y de los copépodos: asociadas a los copépodos, adheridas a detritos y suspendidas en el líquido intervalvar. Las pruebas bioquímicas adicionales efectuadas en TCBS permitieron aislar varias especies del género *Vibrio* pero no de *V. cholerae* (Cuadro 1). La ausencia de *V. cholerae* en este estudio indica que no existe esta bacteria en la zona estudiada, al menos en estado cultivable, esto es, que bacterias como *V. cholerae* pueden entrar en un estado viable (permanecen vivas) pero no se desarrollan en medios de cultivo convencionales (Bogosian *et al.* 1998. *Applied Environmental Microbiology 64*(5): 1736-1742). Cabe señalar que la presencia de cólera en periodos interepidémicos en zonas endémicas se monitorea mediante la técnica de inmunofluorescencia y de ser posible, utilizando anticuerpos monoclonales para observar a los vibriones no cultivables. Por otro lado, el monitoreo de las aguas residuales para determinar la presencia de vibriones cultivables, sería una forma de prever el aporte de estas bacterias provenientes de brotes de cólera entre la población. En este estudio; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que *V. cholerae* en los mejillones estudiados pudiese ser viable pero no en estado cultivable (Singleton *et al.* 1983. *Applied Environmental Microbiology 44*: 1047-1058). Por lo anterior, es necesario efectuar estudios similares durante diferentes meses del año para determinar si existe una estación del año más favorable para *V. cholerae* en el área. Asimismo, se sugiere hacer un estudio similar en una zona donde se hayan presentado casos de cólera en humanos. Es necesario realizar otros estudios utilizando anticuerpos monoclonales o extracción de ADN para determinar la presencia de *V. cholerae* viable pero no cultivable y su serotipo en los copépodos parásitos. Otras pruebas bioquímicas (Cuadro 1) muestran la presencia de *Vibrio alginolyticus* (véase características bioquímicas necesarias para identificar a esta especie en FDA 1992, *op. cit.*). Esta especie de bacteria se encontró en los cultivos sembrados con copépodos vivos machos y hembras ovígeras, con tejido homogeneizado de copépodo, detritos y líquido intervalvar; sin embargo, no se encontró en el agua donde se sonicaron los copépodos (Cuadro 1). Estos resultados sugieren que *V. alginolyticus* puede estar adherido a la superficie y dentro del tracto digestivo de los copépodos, adherido a los detritos y suspendido en el agua intervalvar. Si este fuese el caso, la sonicación no fue suficiente para desprender a *V. alginolyticus* de los copépodos o la sonicación no es una técnica apropiada para desprender a estas bacterias.

Como conclusión podemos decir que existe, como en el caso de copépodos de vida libre, una asociación entre especies del género *Vibrio* (particularmente *V. alginolyticus*) y los copépodos parásitos *Pseudomyicola spinosus* y *Modiolicola gracilis* del mejillón azul *M. galloprovincialis*. Dado que la mayoría de los moluscos bivalvos comestibles pueden contener copépodos parásitos (Ho 1995, *op. cit.*), éstos pueden proveer un vehículo adecuado para la infestación por especies del género *Vibrio*, incluyendo la posibilidad de infestación de *V. cholerae*, patógeno para humanos en zonas donde se ha detectado la enfermedad del cólera. Estos resultados deben

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas aplicadas para determinar la presencia de *Vibrio cholerae* y otras especies de *Vibrio*

	Pruebas aplicadas a las colonias aisladas en agar TCBS						Pruebas aplicadas a especies de *Vibrio* resultado de pruebas anteriores					
Muestra clave	1 T_1N_1 (37° C)	2 Desoxico-lato-Na	3 Oxidasa	4 T_1N_0 (37° C)	5 Gram (-)	6 T_1N_1 (42° C)	7 Ornitina Descarbox	8 Lisina Descarbox	9 Arginina Dihidro	10 T_1N_6	11 T_1N_8	12 T_1N_{10}
AC1	+	+	-	-	+	-				+	+	-
AC2	+	+	+	-	+	-				+	+	-
AC3	+	+	+	-	+	+				+	-	-
AC4	+	-	+	-	+	+				+	-	-
AC5	+	-	+	-	+	+				+	-	-
AC6	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
AC7	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
AC8	+	-	+	-	+	+				+	+	-
HCT1	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
HCT2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
HCT3	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
HCT4	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
IL1	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
IL2	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
IL3	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
IL4	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
WSC1	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
WSC2	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
WSC3	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
WSC4	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
D1	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
D2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
D3	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
D4	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+*
Vc	+	+	+	+	+	+	-	+	-			

AC: copépodos vivos, machos y hembras con sacos ovígeros; HCT: tejido homogeneizado de copépodo; IL: líquido intervalvar; WSC: agua de copépodos sonicados; D: detritos de la cavidad paleal; Vc: línea de *Vibrio cholerae*. El número consecutivo de la muestra corresponde a la clave correspondiente a la colonia aislada. **Vibrio alginolyticus*.

considerarse como una primera aproximación para determinar la relación de *V. cholerae* (serotipo O1) y los copépodos parásitos de moluscos bivalvos comestibles. Actualmente se desarrollan estudios detallados, incluyendo microscopía electrónica de barrido y estudios de ADN para determinar la naturaleza de esta relación.

Agradecimientos. Al doctor Leonardo Lizárraga Partida por proporcionarnos la línea patogénica de *Vibrio cholerae* O1 (Perú C6707) utilizada en este estudio.

JORGE CÁCERES-MARTÍNEZ, PATRICIA MACÍAS-MONTES DE OCA & YANET GUERRERO-RENTERÍA. Laboratorio de Patología de Moluscos del Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Apartado postal 2732, 2800, Ensenada, Baja California, México.

Recibido: 6. XII. 2000
Aceptado: 15. II. 2001